

Received: 2006.04.24
Accepted: 2006.10.09
Published: 2006.11.09

Mechanizmy regulacji odpowiedzi immunologicznej w modelu stwardnienia rozsianego u myszy*

Mechanisms involved in the regulation of immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis in mice

Monika Tutaj, Marian Szczepanik

Zakład Biologii Rozwoju Człowieka Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Streszczenie

Stwardnienie rozsiane (SM) jest przewlekłym autoimmunologicznym schorzeniem zapalnym ośrodkowego układu nerwowego (OUN) przebiegającym z infiltracją limfocytów i makrofagów oraz lokalną demielinizacją. U podłoża zmian chorobowych obserwowanych w przebiegu SM leży reakcja zapalna mediowana przez autoreaktywne klony limfocytów T pomocniczych Th1. Dotychczas brakuje w pełni skutecznych oraz pozbawionych działań niepożądanych metod leczenia SM. W związku z tym istnieje ogromna potrzeba opracowania terapii SM, która pozwoliłaby w sposób swoisty kontrolować przebieg choroby. Bogatym źródłem informacji na temat roli układu immunologicznego w patogenezie SM są badania prowadzone na zwierzętach. Powszechnie stosowanym modelem eksperymentalnym imitującym SM jest eksperymentalne autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia (EAE), które można wywołać u genetycznie predysponowanych szczepów myszy, szczurów czy też małp *rhesus*. Proces autoimmunizacji w przebiegu EAE jest indukowany przez aktywowane autoreaktywne limfocyty T CD4⁺ swoiste względem składników mieliny. Wiedza uzyskana dzięki badaniom prowadzonym na modelu EAE, bezpośrednia ocena zmian w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym z udziałem nowoczesnych metod badawczych pozwala na lepsze zrozumienie natury zaburzeń odpowiedzi immunologicznej w SM, a tym samym na możliwość manipulacji poszczególnymi komponentami tej odpowiedzi.

Słowa kluczowe:

stwardnienie rozsiane • eksperymentalne autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia • tolerancja • komórki T supresyjne • cytokiny

Summary

Multiple Sclerosis (MS) is a chronic inflammatory autoimmune disease of the central nervous system (CNS) characterized by the presence of cellular infiltrates consisting primarily of lymphocytes and macrophages and localized areas of demyelination in the CNS. MS is thought to be initiated by self-reactive CD4⁺ Th1 T cells. Thus far, treatment modalities for MS are limited, with the most common acting nonspecifically on the immune system, resulting in a general immunosuppression accompanied by severe side effects. There is a large demand for developing MS therapy that particularly targets pathogenic myelin-specific T cells. Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) is a well-characterized animal model that mimics many of the disease symptoms

* Praca powstała dzięki wsparciu finansowemu Komitetu Badań Naukowych w ramach grantów: 3 PO 5B 091 25, 2 PO 5A 157 28 oraz 2PO 5A 208 29.

of MS, including the presence of cellular infiltrates and demyelination. EAE can be actively induced in genetically susceptible strains of mice, rats, and monkeys and is mediated by activated autoreactive CD4⁺ T cells that are specific to MBP (myelin basic protein). The knowledge acquired using EAE allows us to better understand the pathogenesis of MS and thus manipulate particular components of the immune response in order to develop an efficient therapy.

Key words: multiple sclerosis • encephalomyelitis • tolerance • suppressor T cells • cytokines

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_60/9821.pdf

Word count: 6533

Tables: –

Figures: 1

References: 78

Adres autora: dr hab. n. med. Marian Szczepanik, Zakład Biologii Rozwoju Człowieka CM UJ, ul. Kopernika 7, 31-034 Kraków; e-mail: mmszczep@cyf-kr.edu.pl

Wykaz skrótów: **EAE** – eksperymentalne autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia (experimental allergic encephalomyelitis); **CAM** – międzykomórkowa molekula adhezyjna (intercellular adhesion molecule); **IFN** – interferon; **IP** – białko indukowane przez interferon (interferon-inducible protein); **MBP** – zasadowe białko mieliny (myelin basic protein); **MCP** – białko chemotaksji monocytów (monocyte chemoattractant protein); **MHC** – główny układ zgodności tkankowej (major histocompatibility complex); **MIP** – białko zapalne makrofagów (monocyte inflammatory protein); **MOG** – mielinowa glikoproteina oligodendrocytów (myelin oligodendrocyte glycoprotein); **NKT** – naturalna komórka cytotoksyczna T (natural killer T lymphocyte); **PLP** – białko proteolipidowe (proteolipid protein); **RANTES** – regulowany przez aktywację; ekspresja i wydzielanie przez prawidłowe (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted); **SM** – stwardnienie rozsiane (sclerosis multiplex); **TCR** – receptor limfocytów T (T-cell receptor); **TGF** – transformujący czynnik wzrostu (transforming growth factor); **Th** – limfocyt T pomocniczy (T helper); **TNF** – czynnik martwicy nowotworu (tumor necrosis factor); **Ts/Tr** – limfocyt T supresorowy/regulatorowy; **VCAM** – cząsteczka adhezji komórkowej naczyń (vascular cell adhesion molecule); **VLA** – antygen bardzo późny (very late antigen).

STWARDNIENIE ROZSIANE

Stwardnienie rozsiane (SM) jest jedną z najczęściej występujących chorób demielinizacyjnych u ludzi, charakteryzującą się przewlekłym stanem zapalnym ośrodkowego układu nerwowego (OUN). SM zaliczane jest do grupy schorzeń autoimmunizacyjnych o wciąż nieznanej etiopatogenezie. Wiele różnych czynników wpływa na rozwój tego schorzenia, ale do najważniejszych należą: genetyczna predyspozycja, infekcje oraz zjawiska o charakterze autoagresji. Obecnie powszechnym uznaniem cieszą się następujące teorie powstawania SM: wirusowa, zakładająca, że czynnikiem inicjującym chorobę jest infekcja wirusowa; immunologiczna, wiązana z aktywacją autoreaktywnych klonów limfocytów T; wirusowo-immunologiczna, stanowiąca wypadkową wspomnianych teorii, gdzie czynnik wirusowy stanowi element inicjujący chorobę, podczas gdy dalszy proces chorobowy ma charakter immunologiczny.

Z badań epidemiologicznych wynika, że również czynniki środowiskowe mają wpływ na zachorowalność na SM, gdyż migracje ludzi do innych stref klimatycznych przed osiągnięciem dojrzałości (przed 15 r.ż.) mogą zwiększyć lub zmniejszyć ryzyko zachorowania na SM. Ponadto opisano epidemiczne wystąpienie SM wśród izolowa-

nych populacji ludzi (Wyspy Faroe, Islandia) po zetknięciu się z Europejczykami lub mieszkańcami Ameryki Północnej, co sugeruje zakaźny charakter czynnika indukującego SM [54].

Obserwacje kliniczne wskazują na wiele patogenów, które mogą powodować choroby demielinizacyjne obwodowego lub ośrodkowego układu nerwowego. Stwierdzono, że należą do nich: wirus Epsteina-Barr (EBV), cytomegalii (CMV), odry, ludzki wirus opryszczki 6 (HHV-6), wirus ludzkiego niedoboru odporności (HIV), a także mikoplazma i pałeczka *Campylobacter jejuni*. Epizody ostrej demielinizacji mogą wystąpić u ludzi po przejściu licznych infekcji wirusowych i w wielu przypadkach obserwuje się prawie identyczne zmiany w substancji białej OUN. Przypuszczalnie wspólny mechanizm demielinizacji wynika z bezpośredniego uszkodzenia oligodendrocytów lub z rozwoju poinfekcyjnych zaburzeń odpowiedzi immunologicznej i niszczenia własnej tkanki nerwowej w rozwijającym się procesie autoagresji [27].

Dowodem na udział czynnika infekcyjnego w rozwoju SM mogą być wyniki badań klinicznych wskazujące na korelację między wystąpieniem infekcji wirusowej u pacjentów z SM, a pogorszeniem przebiegu choroby. U cho-

rych odnotowano m.in. podwyższone stężenie interferonu α (IFN- α) i proteiny indukowanej przez IFN- α (MxA), oraz dużą ekspresję antygenów MHC klasy I na oligodendrocytach w trakcie infekcji, co może mieć związek z cytotoksycznością zależną od limfocytów T CD8⁺. Natomiast podwyższone miano przeciwciał antywirusowych może świadczyć jedynie o zaburzeniu odpowiedzi immunologicznej pacjentów. Warto zaznaczyć, że wyizolowano kwasy nukleinowe, co najmniej czternastu wirusów z mózgów pacjentów, jednak do dzisiaj nie ustalono istotnej zależności między zachorowalnością na SM, a konkretną infekcją wirusową. Nie wykryto również żadnego zewnątrz-pochodnego czynnika sprawczego w aktywnych płytkach demielinizacji [3].

W ostatniej dekadzie pojawiło się wiele doniesień o obecności wirusa opryszczki w miejscach uszkodzeń substancji białej pacjentów, szczególnie odmian wirusa typu I, II i VI. Natomiast zastosowanie leku przeciwoopryszczkowego (acyklowir) w terapii prowadziło do zmniejszenia liczby ataków choroby [15]. Poczynione obserwacje ponownie wzbudziły zainteresowanie infekcyjnymi hipotezami etiologii SM.

UDZIAŁ MECHANIZMÓW IMMUNOLOGICZNYCH W PATOGENEZIE SM

Pierwszy przypadek SM opisał francuski neurolog Jean-Martin Charcot w 1868 r., który zaobserwował okołonaczyniowe nacieki komórek zapalnych w substancji białej mózgu i rdzenia kręgowego pacjentów z epizodami neurologicznych dysfunkcji [19,25]. Rozwój nowoczesnych metod badawczych pozwolił stwierdzić, że lokalnie w OUN dochodzi do infiltracji limfocytów T i makrofagów (Mf) z wysoką ekspresją MHC klasy II, do uszkodzenia oligodendrocytów i osłonek mielinowych neuronów w postaci płytek demielinizacyjnych (plak), a także proliferacji astrocytów. Plaki najczęściej umiejscawiają się w okolicach okołokomorowych, nerwu wzrokowego, pnia mózgu oraz rdzenia kręgowego [25,54].

Patogeneza i etiologia SM jest nieznana, jednak stale rośnie liczba dowodów świadczących o autoimmunologicznym podłożu choroby. W badaniach laboratoryjnych stwierdza się obecność przeciwciał oligoklonalnych w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR) oraz ich brak w surowicy pacjentów z SM, co wskazuje na aktywację układu immunologicznego. Z pośrednich obserwacji wynika, że stosowanie w leczeniu czynników immunomodulujących, takich jak: IFN- β czy octan glatirameru, oraz leków immunosupresyjnych: cyklofosfamid, metotreksat, mitoksantron, może spowalniać rozwój choroby interferując z toczącym się procesem zapalnym [27]. Ponadto, we krwi obwodowej chorych obserwowano spadek liczby supresyjnych limfocytów T CD4⁺ CD45R⁺, a także zaburzenie ich funkcji supresyjnych po aktywacji *in vitro*, co może sugerować defekt mechanizmów regulacyjnych [54].

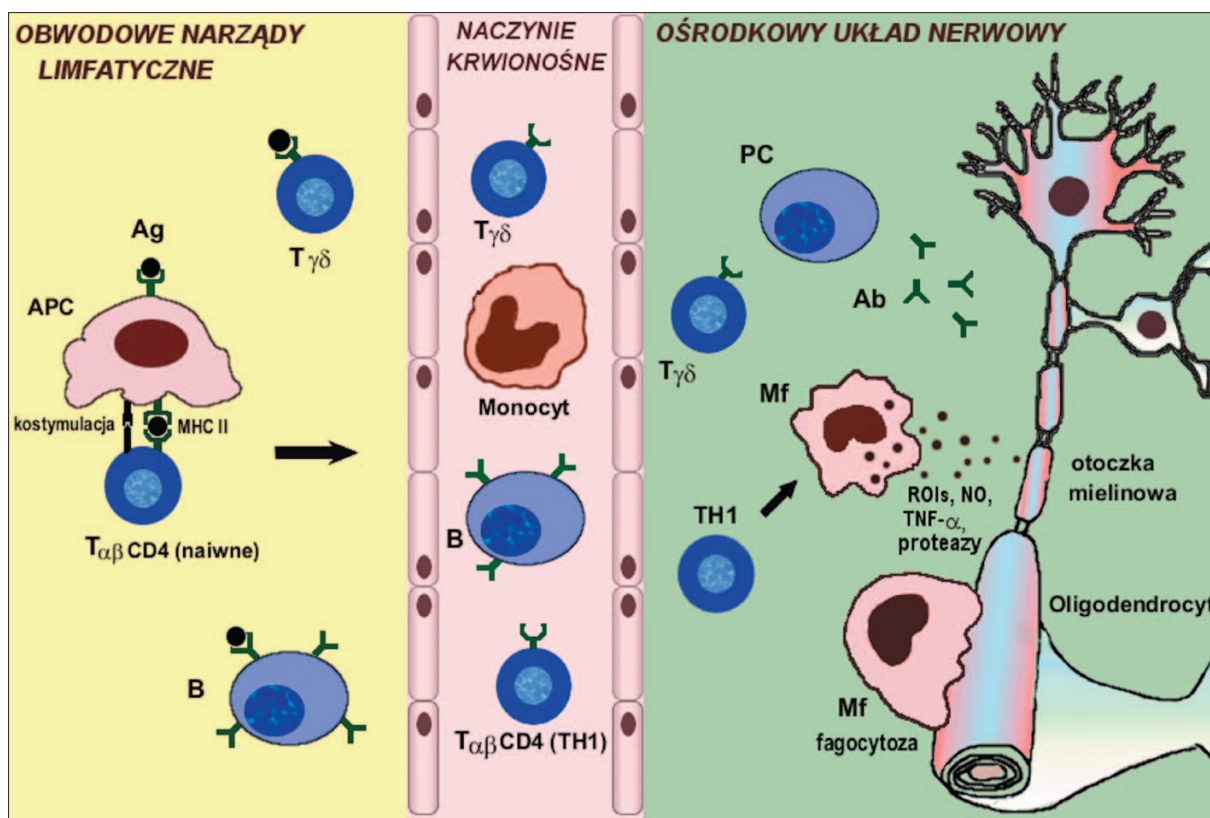
Wielu badaczy uważa, że zasadniczą rolę w patogenezie SM odgrywają autoreaktywne limfocyty T. Komórki T, swoiste względem antygenów mieliny, izolowane z krwi pacjentów stanowią heterogenną populację komórek w stosunku do ludzi zdrowych [54]. U pacjentów z ostrym napadem choroby izolowano autoreaktywne limfocyty T, które wytwarzały cytokiny profilu komórek Th1: IFN- γ i TNF- α

(prozapalnych), podczas gdy klony komórek izolowane w trakcie remisji wykazywały zwiększone wytwarzanie IL-10 i TGF- β (przeciwpapalnych) [20].

Przypuszcza się, że aktywacja autoreaktywnych limfocytów T zachodzi obwodowo i może być wynikiem krzyżowej reakcji w trakcie np.: infekcji wirusowej (mimikra molekularna), stymulacji na zasadzie „przygodnego widza”, stymulacji przez superantygeny lub produkty patogenów naśladujące cytokiny, chemokiny bądź receptory chemokin gospodarza [56]. Aktywowane limfocyty T wykazują ekspresję LFA-1 oraz VLA-4, które ułatwiają przyleganie do komórek śródbłonna. U chorych na SM stwierdzono w naczyniach mikrokrążenia mózgu oraz w obrębie plaka wysoką ekspresję cząstek MHC klasy II, ICAM-1, VCAM-1 oraz E-selektyny [70]. Część spośród wspomnianych molekuł adhezyjnych może uczestniczyć w migracji limfocytów T do miąższu mózgu, a wysoka ekspresja antygenów zgodności tkankowej MHC klasy II może prowadzić do aktywacji limfocytów T autoreaktywnych [56]. Po rozpoznaniu autoantygeny limfocyty aktywują Mf, które wydzielają wolne rodniki tlenowe (ROIs), tlenek azotu (NO), enzymy proteolityczne i za pośrednictwem bezpośredniej fagocytozy uszkodzają osłonki mielinowe neuronów. Uwalniane przez komórki Th1: IFN- γ i TNF- α uszkodzają oligodendrocyty oraz mogą stymulować astrocyty lub mikroglej do ekspresji molekuł kostymulujących i pełnienia funkcji APC. Jednocześnie istnieją doniesienia, iż w procesie degradacji osłonek mielinowych pewną rolę odgrywają także limfocyty T cytotoksyczne, w tym również limfocyty T $\gamma\delta$ [50,54]. Na ryc. 1 przedstawiono najważniejsze komponenty immunologiczne zaangażowane w patomechanizm SM.

W 1948 r. E. Kabat odkrył podwyższone stężenie oligoklonalnych immunoglobulin w PMR chorych na SM. Parametr ten stanowi do dzisiaj jeden z najczulszych markerów tej choroby (ponad 95% pacjentów pozytywnych), niestety nieswoisty, gdyż wysokie wartości odnotowano również w innych schorzeniach demielinizacyjnych. Ciekawym spostrzeżeniem było odkrycie, że u wielu pacjentów występowały przeciwciała skierowane przeciwko immunodominującemu peptydowi MBP (85-99), który był rozpoznawany przez autoreaktywne limfocyty T. Wskazuje to na udział limfocytów T w podtrzymywaniu wytwarzania przeciwciał antymielinowych. Limfocyty B mogą zatem wytwarzać autoprzeciwciała po aktywacji analogicznej do limfocytów T i potęgować destrukcję własnych tkanek w procesie autoagresji. Nie ma jednak wystarczających dowodów na to, by uznać limfocyty B lub autoprzeciwciała za przyczynę rozwoju SM. Istnieją również przeciwstawne doniesienia, które świadczą o udziale autoprzeciwciał w mediowaniu procesu remielinizacji [56].

Tematem dyskusji pozostaje rola astrocytów i mikrogleju w patogenezie SM i w rozwoju procesu zapalnego w OUN. Istnieją doniesienia o pełnionej przez nie roli efektywnych APC, które podtrzymują toczący się proces zapalny, ale jednocześnie sugeruje się, że wykazują aktywność immunosupresyjną. Komórki mikrogleju uznaje się za bardziej kompetentne APC w porównaniu z astrocytami, ze względu na jednoczesną ekspresję MHC klasy II oraz cząstek kostymulujących B-7, których obecności nie stwierdzono na astrocytach w miejscach uszkodzeń



Ryc. 1. Mechanizmy immunologiczne zaangażowane w patomechanizm stwardnienia rozsianego; APC – komórki prezentujące antygen; Ag – antygen; Ab – przeciwciało; B – limfocyt B; MHCII – antygen zgodności tkankowej klasy II; Mf – makrofag; Tαβ – limfocyt T z receptorem antygenowym typu αβ; Tγδ – limfocyt T z receptorem antygenowym typu γδ, PC – plazmocyty

substancji białej. Obserwowano również, że astrocyty aktywują *in vitro* limfocyty T tylko po uprzednim kontakcie z mikroglejem. Metodą immunohistochemiczną wykazano, że komórki mikrogleju i astrocyty są zdolne do wytwarzania wielu cytokin: IL-1β, IL-2, -4, -10, TNF-α, TGF-β [56]. Ponadto, astrocyty mogą wytwarzać IFN-γ i wykazywać ekspresję molekuly CD1, której obecność stwierdzono w pląkach demielinizacyjnych u chorych na SM (szczególnie CD1b) [2].

Uwalnianie cytokin przeciwzapalnych TGF-β i IL-10 przez mikroglej i astrocyty może świadczyć o tym, że komórki te mogą uczestniczyć w negatywnej regulacji odpowiedzi immunologicznej w OUN i działać supresyjnie na limfocyty Th1. Ponadto, wykazano, że na astrocytach i neuronach ulegają ekspresji molekuly FasL, co może stanowić immunologiczną barierę mózgową, ograniczającą infiltrację komórek zapalnych. Częsteczki FasL są również obecne na powierzchni limfocytów T i komórkach mikrogleju, jednak w SM obserwowano obniżoną ekspresję FasL na powierzchni autoreaktywnych limfocytów T, co z kolei może wskazywać na zaburzenie zdolności indukowania apoptozy tych komórek u chorych na SM [56].

Ostatnie doniesienia wskazują na zasadniczą rolę komórek dendrytycznych (DC) w patogenezie chorób autoimmunologicznych. Pozyskane z krwi obwodowej chorych na SM komórki dendrytyczne wykazują wysoką ekspresję molekuly CD1a, za pośrednictwem której mogą prezentować lipidowe antygeny (Ag) limfocytom NKT, a ponadto DC wy-

twarzają większe ilości cytokin prozapalnych (TNF-α, IL-6 oraz IL-12) w porównaniu z grupą kontrolną ludzi zdrowych [36]. Jednocześnie wiadomo, że DC spośród APC mają największą zdolność prezentacji Ag naiwnym limfocytom T, są więc najlepszymi kandydatami do indukowania przełamania tolerancji na autoantygeny. Przypuszcza się, że leczenie IFN-β hamuje zdolność uwalniania IL-12 przez DC, co wpływa supresyjnie na wydzielanie IFN-γ przez limfocyty T efektorowe [5].

Do innych zmian towarzyszących SM należy duże stężenie chemokin obserwowane w PMR pacjentów cierpiących na SM, takich jak: IP-10 (CXCL10), MIG (CXCL9) oraz RANTES (CCL5), przy jednoczesnym spadku MCP-1. Prawie 90% limfocytów T izolowanych z PMR, a tylko 40% komórek krwi obwodowej wykazało dużą ekspresję receptorów IP-10/MIG (CXCR3). W przypadku receptorów RANTES (CCR5) różnica między komórkami PMR i krwi nie była tak duża. Przypuszcza się, że ekspresja receptorów chemokin na powierzchni limfocytów, aktywowanych Mf, czy monocytów może mieć bezpośredni związek z patogenezą SM. Same chemokiny oprócz roli chemoatraktantów pełnią funkcje regulacyjne w procesach aktywowania limfocytów T, ich różnicowania oraz w wytwarzaniu przez nie cytokin [27]. W modelu zwierzęcym choroby, chemokiny pojawiają się w mózgu wtórnie w stosunku do komórkowego nacieku zapalnego [56].

Lucchinetti i wsp. oraz Lassman i wsp. zasadniczo zmienili podejście do patologii SM. Wyróżnili cztery różne modele

demielinizacji, z których dwa dotyczą autoimmunologicznej reakcji przeciwko mielinie, a dwa wiążą się z uszkodzeniem oligodendrocytów [38]. Odkrycia immunopatologii oraz wieloletnie obserwacje klinicystów sugerują, że SM nie jest pojedynczą jednostką chorobową, lecz obejmuje grupę chorób demielinizacyjnych o podobnej klinicznej prezentacji. Z każdym proponowanym schematem uszkodzenia otoczek mielinowych wiąże się prawdopodobnie odmienna etiologia, co może stanowić wyjaśnienie dla rozbieżnych wyników uzyskiwanych przez różne zespoły badawcze.

EKSPERYMENTALNE AUTOIMMUNOLOGICZNE ZAPALENIE MÓZGU I RDZENIA U ZWIERZĄT (EAE)

Powszechnie stosowanym modelem eksperymentalnym imitującym SM jest eksperymentalne autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia (EAE), które można wywołać u genetycznie predysponowanych szczepów myszy, szczurów czy też małp *rhesus* przez immunizację Ag mieliny podawanymi wraz z kompletnym adiuwantem Freund (CFA). EAE, podobnie jak SM, jest demielinizacyjną chorobą OUN, a jej przebieg zależy również od czynników genetycznych i środowiskowych. W odróżnieniu jednak od SM etiologia EAE jest zdefiniowana. Za rozwój choroby są odpowiedzialne swoiste dla składników mieliny limfocyty Th1 CD4⁺, które wytwarzają IFN- γ , IL-2, TNF- β [47]. W patogenezie EAE są zaangażowane również limfocyty Th2, limfocyty T CD8⁺, Mf, limfocyty B i prawdopodobnie komórki NK.

Inspiracją do opracowania modelu zwierzęcego imitującego swym przebiegiem SM były zaburzenia neurologiczne obserwowane u niektórych ludzi, w trakcie pierwszych prób szczepień przeciw wirusowi wścieklizny, wykonywanych pod koniec XIX w. Szczepionkę pozyskiwano z homogenatu rdzenia kręgowego królików zainfekowanych wirusem wścieklizny. Zespół objawów, który nazwano poszczepiennym zapaleniem mózgu i rdzenia, początkowo przypisywano wirusowi, jednak Remlinger wykazał, że za rozwój choroby odpowiedzialne są czynniki zawarte w tkance nerwowej. W 1947 r. Kabat z użyciem adiuwantu indukował pierwsze eksperymentalne autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia (EAE) u zwierząt naczelnych. U małp, które otrzymały homogenat rdzenia kręgowego pozbawiony wirusa, rozwijała się po pewnym czasie choroba demielinizacyjna w identyczny sposób jak u zwierząt immunizowanych homogenatem zawierającym wirus. Z kolei w 1949 r. Olitsky wywołał demielinizacyjną chorobę u myszy i od tego czasu mysie EAE zostało uznane za model zwierzęcy choroby demielinizacyjnej OUN. W 1951 r. odkryto, że mielina jest zbudowana w 50% z proteolipidu (PLP), a w 1962 r. Einstein zidentyfikował zasadowe białko mieliny (MBP) jako Ag OUN wywołujący EAE (30% mieliny). Ostatnim odkrytym składnikiem indukującym EAE była mielinowa glikoproteina oligodendrocytów (MOG) (0,01–0,05% mieliny) [19]. Dalsze badania koncentrowały się nad określeniem mechanizmów łączących u podstaw EAE.

W 1981 r. udowodniono udział swoistych względem Ag mieliny limfocytów T CD4⁺ w indukcji EAE poprzez adoptywny transfer choroby na naiwnych syngenicznych biorców z udziałem tych komórek [47]. Postać choroby wywołana za pośrednictwem adoptywnego transferu komórek

efektorowych została określona mianem pasywnej w odróżnieniu od aktywnej postaci EAE, indukowanej samym Ag z adiuwantem. Dalsze badania prowadzone na modelu zwierzęcym SM wykazały obecność autoreaktywnych limfocytów T swoistych dla antygenów mieliny także w organizmie zdrowych osobników.

Po odkryciu w 1986 r. subpopulacji limfocytów pomocniczych Th1 i Th2 różniących się profilem wytwarzanych cytokin [42], naukowcy podjęli badania w celu ustalenia, do której populacji należą komórki efektorowe EAE. Wykazano, że autoreaktywne MBP-swoiste komórki odznaczały się wytwarzaniem cytokin typowych dla limfocytów Th1, a transfer tych komórek indukował EAE u naiwnych biorców.

Obecnie eksperymentalne autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia są charakteryzowane jako reakcja nadwrażliwości typu późnego (DTH), która rozwija się wskutek infiltracji OUN przez limfocyty Th1 uwalniające cytokiny prozapalne (IFN- γ , TNF- β , IL-2) oraz Mf. Autoreaktywne komórki T rozpoznają Ag mieliny, które mogą być prezentowane przez okołonaczyniowe Mf bariery krew-mózg [27]. Po aktywacji limfocyty T uwalniają cytokiny i chemokiny, które zmieniają ekspresję molekuł adhezyjnych na otaczających komórkach, zwiększa się przepuszczalność bariery krew-mózg i dochodzi do rekrutacji komórek z krążenia do miąższu mózgu.

UDZIAŁ CYTOKIN W ROZWOJU EAE

Rolę poszczególnych cytokin w rozwoju EAE badano podając egzogenne cytokiny, ich inhibitory, wykorzystując w doświadczeniach szczepy myszy z odpowiednim defektem genetycznym (myszy typu „knock-out”) oraz oceniano poziom mRNA cytokin metodami biologii molekularnej. Dzięki tym badaniom uzyskano wiele informacji o mechanizmach regulacyjnych odpowiedzi immunologicznej. Stwierdzono m.in., że podanie zwierzętom INF- γ , wbrew oczekiwaniom, redukuje objawy EAE, natomiast iniekcja przeciwciał neutralizujących INF- γ (mAb anty-INF- γ) zaostrza proces chorobowy. Wobec powyższego można przypuszczać, że INF- γ nie jest niezbędny w rozwoju EAE. U pacjentów z SM podanie INF- γ prowadzi do pogorszenia przebiegu choroby, co może sugerować odmienną funkcję tej cytokiny u różnych gatunków [45]. W badaniach nad rolą TNF- α w EAE wykazano, że podanie TNF- α stymuluje rozwój EAE i proces demielinizacji u zwierząt, natomiast mAb anty-TNF- α znacznie redukuje proces zapalny w OUN i uniemożliwiają rozwój pasywnej postaci choroby. Zadowalające wyniki leczenia EAE uzyskano stosując również rozpuszczalną postać receptora TNF- α (sTNF-R) [51]. Z kolei badania z wykorzystaniem defektywnych szczepów myszy TNF- α –/– dostarczyły sprzecznych wyników.

Wykazano również, że podanie IL-2 nasila objawy EAE indukowanego przez transfer swoistych względem Ag mieliny limfocytów T, przyspieszając zwiększając ekspansję tych komórek. Z kolei podanie mAb anty-IL-2 drastycznie redukuje objawy pasywnego EAE [21]. W innych badaniach zaobserwowano, że łączne podanie IL-2 i dużej dawki Ag prowadzi do nawrotu EAE, mimo znacznie zredukowanej liczby autoreaktywnych limfocytów T. Podanie

egzogennej cytokiny może stymulować komórki, które przyczyniają się do rozwoju procesu zapalnego i demielinizacji [54].

W badaniach nad rolą IL-6 wykazano, że podawanie zwierzętom tej cytokiny zaostrza przebieg EAE, a blokowanie działania IL-6 hamuje rozwój choroby. Myszy defektywne IL-6 –/– są odporne na indukcję EAE, jednak iniekcja IL-6 w fazie przedklinicznej przywraca możliwość rozwoju choroby u tych zwierząt. Adoptywny transfer aktywnych *in vitro* limfocytów T z defektem wytwarzania IL-6 nie stymuluje rozwoju choroby, zarówno u biorców z defektem wytwarzania IL-6, jak również u zwierząt kontrolnych. Transfer limfocytów T wydzielających IL-6 prowadzi z kolei do rozwoju EAE u biorców defektywnego szczepu myszy IL-6 –/– [40]. Przedstawione obserwacje na temat roli IL-6 w EAE świadczą o jej krytycznym udziale w fazie indukcyjnej EAE.

W badaniach nad mechanizmami immunologicznymi w EAE obserwowano, że wiele chemokin oraz ich receptory pełnią istotną rolę w przebiegu choroby. Zmiany w poziomie chemokin: MCP-1, RANTES, MIP-1 α , IP-10 należących do rodziny C-C i C-X-C odnotowano w fazie początkowej choroby oraz w czasie remisji EAE. W czasie ataku choroby, w OUN stwierdzono dużą ekspresję receptorów chemokin: CCR1, CCR2 i CCR5. Podawanie zwierzętom mAb neutralizujących poszczególne chemokiny wykazało, że krytyczna w fazie indukcyjnej EAE jest MIP-1 α , natomiast mediatorem nawrotu choroby jest MCP-1 [31]. Stwierdzono, że źródłem chemokin mogą być autoreaktywne limfocyty T, które po rozpoznaniu Ag mieliny w OUN same uwalniają chemokiny lub stymulują komórki mięszu mózgu do ich wydzielania, co prowadzi do rekrutacji Mf i limfocytów T z krążenia. Natomiast w badaniach *in vitro* wykazano, że chemokiny mogą być wytwarzane przez astrocyty, mikroglej, pericyty i komórki śródbłonna [27].

Poza pozytywną regulacją odpowiedzi immunologicznej w przebiegu EAE przez cytokiny prozapalne, wspomniana reakcja zapalna jest również regulowana negatywnie przez przeciwzapalne cytokiny: IL-4, -10, -13 oraz TGF- β . Z wielu obserwacji wynika, że cytokiny, takie jak IL-4, -10 oraz TGF- β odpowiadają za proces remisji choroby i zdrowienia zwierząt. Podawanie IL-4 redukuje objawy choroby u zwierząt, a znaczny wzrost stężenia tej cytokiny odnotowano po podawaniu Ag mieliny drogą pokarmową lub dużych dawek Ag dootrzewnowo [12]. Z kolei u myszy defektywnych IL-4 –/– obserwowano EAE o ciężkim przebiegu klinicznym, z nasiloną infiltracją komórek zapalnych do OUN. Warto tutaj zaznaczyć, iż u myszy IL-4 –/– w fazie zdrowienia odnotowano zwiększone stężenie IL-10 w OUN [27].

IL-10 wytwarzana przez limfocyty Th2, limfocyty T regulacyjne, Mf, astrocyty, mikroglej, może blokować wytwarzanie komórek Th1 oraz hamować prezentację Ag i wytwarzanie NO przez Mf. Podając IL-10 *in vivo* w trakcie rozwoju EAE uzyskiwano niejednoznaczne wyniki, natomiast podając mAb anti-IL-10 obserwowano tylko nieznacznie cięższy przebieg choroby. Z kolei myszy defektywne IL-10 –/– są bardziej podatne na EAE i rozwijają cięższą postać choroby [6]. Ciekawej obserwacji dokona-

no w doświadczeniach z użyciem transgenicznych myszy zdolnych do wytwarzania ludzkiej IL-10. Zwierzęta te wykazywały niską zachorowalność oraz łagodniejszy przebieg EAE, jednak stwierdzono u nich proliferację limfocytów Th1. Przypuszczalnie IL-10 hamuje funkcje efektorowe limfocytów Th1, natomiast cytokina ta nie ma wpływu na różnicowanie się komórek T [22].

TGF- β jest cytokiną wytwarzaną przez liczne komórki organizmu, która ma plejotropowy wpływ na funkcjonowanie układu odpornościowego. Liczne badania wskazują, że cytokina ta ma istotny wpływ na przebieg EAE. Podawanie TGF- β *in vitro* do hodowli komórek swoistych względem Ag mieliny redukuje ich zdolność do przeniesienia EAE na biorców, natomiast podawanie *in vivo* łagodzi przebieg choroby. Aplikowanie mAb anti-TGF- β w początkowej fazie choroby zaostrza kliniczne objawy EAE i powoduje bardziej rozległe uszkodzenia. Ponadto obserwowano, że TGF- β hamuje objawy innych eksperymentalnych chorób autoimmunologicznych, co wskazuje na immunoregulacyjną rolę tego czynnika [27]. W innych badaniach wykazano, że wytwarzanie TGF- β 1 miejscowo, w mięszu mózgu przez komórki gleju prowadzi do nasilenia infiltracji komórek zapalnych, powstawania uszkodzeń oraz zwiększa podatność na choroby OUN mediowane przez komórki układu immunologicznego [75]. Wobec powyższego wydaje się, że lokalna ekspresja TGF- β w OUN nie przyczynia się do zahamowania rozwoju EAE, a nawet może potęgować rozwój choroby. Istotnym zagadnieniem przyszłych badań staje się ustalenie, czy miejscem protekcyjnego działania TGF- β jest OUN, czy obwodowe narządy limfatyczne.

W regulacji przebiegu EAE równie ważne są czynniki wzrostowe zaangażowane w procesie odbudowy otoczek mielinowej i przywróceniu funkcji przewodzenia impulsów nerwowych. Należy do nich czynnik wzrostu nerwów (NGF), który oprócz zasadniczej roli troficznej może pełnić funkcje modulowania aktywności komórek immunologicznych [54]. Insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF-1) jest silnym induktorem rozwoju oligodendrocytów i wytwarzania mieliny. Podanie IGF-1 w kompleksie z IGFBP3 – białkiem wiążącym IGF-1, opóźnia wystąpienie choroby przypuszczalnie hamując infiltrację komórek zapalnych do OUN. Odnotowano zmniejszoną ekspresję ICAM-1 w OUN, co wpłynęło na przepuszczalność bariery krew-mózg [37]. Do przeżycia i proliferacji oligodendrocytów przyczynia się również glejowy czynnik wzrostu (GGF-2), który opóźnia i łagodzi objawy choroby. Myszy traktowane GGF-2 wykazują intensywną remielinizację w miejscach uszkodzeń substancji białej w stosunku do zwierząt nietraktowanych GGF-2 [14].

Model zwierzęcy SM od wielu lat stanowi bogate źródło informacji na temat mechanizmów regulacji odpowiedzi immunologicznej, jest pomocny w opracowaniu nowych metod leczenia, a także umożliwia przewidzenie niekorzystnych efektów działania. Jednak mimo wielu podobieństw między stwardnieniem rozsianym a alergicznym zapaleniem mózgu i rdzenia, należy pamiętać o istotnych różnicach w budowie i funkcji układu immunologicznego u myszy i u ludzi. Metody, które u zwierząt prowadziły do zahamowania rozwoju lub nawet wyleczenia EAE, u ludzi mogą pozostawać bez wpływu na SM, bądź nawet pogarszać przebieg choroby.

METODY TERAPII STWARDNIENIA ROZSIANEGO

Współcześnie metody leczenia stwardnienia rozsianego polegają na leczeniu rzutu choroby, łagodzeniu objawów oraz leczeniu modyfikującym przebieg choroby. Glikokortykosteroidy podawane w okresie rzutu choroby, skracają okres niesprawności, likwidują objawy rzutu lub znacznie je łagodzą, ale nie wykazują korzystnego wpływu na długofalowy przebieg choroby, natomiast stosowanie ich wiąże się ze znacznymi objawami niepożądanymi [49,53]. Leki immunosupresyjne, podobnie jak antymitotyki nie są obecnie zalecane, ponieważ mogą dawać objawy niepożądane.

Leki modyfikujące przebieg SM: interferon β , glatiramer oraz poliwalentne immunoglobuliny różnią się mechanizmem działania. Rekombinowany interferon β zmniejsza częstość i ciężkość rzutów oraz liczbę nowych ognisk. Interferon korzystnie modyfikuje odporność komórkową przez zwiększenie wytwarzania przeciwwzpalnej cytokiny IL-10 oraz zmniejszenie wytwarzania IFN- γ . Jednak u prawie 30% pacjentów leczonych tym preparatem powstają przeciwciała neutralizujące, obniżające jego aktywność i zmniejszające działanie terapeutyczne [49].

Dokładny mechanizm działania glatirameru (syntetycznego polimeru L-alaniny, kwasu L-glutaminowego, L-lizyny oraz L-tyrozyny) nie jest znany [65]. W licznych badaniach wykazano, iż substancja ta może konkurować z wieloma antygenami OUN (MBP, PLP, MOG) o miejsce wiązania w obrębie MHC klasy II, zaburzając fazę indukcyjną i efektorową odpowiedzi immunologicznej. Co więcej, stwierdzono, że kompleksy glatiramer – MHC klasy II indukują powstawanie limfocytów supresyjnych zdolnych do hamowania procesu zapalnego mediowanego przez komórki Th1 [1]. Do leków zmniejszających postęp choroby należą też poliwalentne immunoglobuliny, których podawanie zmniejsza liczbę rzutów, co jak się uważa jest wynikiem interakcji fragmentu Fc wspomnianych immunoglobulin z receptorami FcR znajdującymi się na powierzchni leukocytów [68].

EKSPERYMENTALNE METODY TERAPII STWARDNIENIA ROZSIANEGO

W wielu ośrodkach naukowych na całym świecie próbuje się opracować metodę terapii SM pozwalającą w sposób swoisty hamować proces zapalny w OUN. Podejmowano próby:

- Immunizacji zwierząt laboratoryjnych peptydami obszarów zmiennych V receptorów antygenowych limfocytów T (TCR) pochodzących z komórek T autoreaktywnych. Niestety, rezultaty były niezadawalające [64].
- Szczepienia atenuowanymi autoreaktywnymi limfocytami T, które prowadziło do indukowania wytwarzania przeciwciał antyklonotypowych i do delecji swoistych autoreaktywnych limfocytów T, a w konsekwencji do zahamowania rozwoju EAE [55].
- Podawanie syntetycznych analogów peptydów łańcucha β Ag MHC klasy II, które prowadziło do zahamowania rozwoju EAE u zwierząt doświadczalnych, prawdopodobnie w wyniku powstawania przeciwciał auto-anty-MHC II [11]. U ludzi złożoność kompleksu MHC utrudnia opracowanie skutecznej terapii.
- W metodach terapii genowej wykorzystanie autoreaktywnych limfocytów T jako nośnika odpowiednich ge-

nów. Działanie terapeutyczne ma polegać na uwalnianiu w miejscu toczącego się procesu zapalnego cytokin przeciwzapalnych, hamujących działanie patogennych limfocytów Th1, bądź na dostarczaniu do miejsca odczynu zapalnego substancji ułatwiających regenerację oligodendrocytów. Możliwe, że w przyszłości metoda ta zostanie wykorzystana w leczeniu chorych na SM [67].

- Zastosowania estrogenu w terapii schorzeń autoimmunizacyjnych. Podanie zwierzętom 17 β -estradiolu lub półsyntetycznej pochodnej łagodzi przebieg EAE i znacznie redukuje objawy kliniczne choroby u myszy. Mechanizm działania leku jest wynikiem zmniejszenia wytwarzania cytokin prozapalnych przez aktywowane komórki T, redukcji syntezy chemokin oraz autoprzeciwciał, przy jednoczesnym wzroście syntezy TGF- β . Obserwuje się również hamowanie powstawania nacieku zapalnego w OUN [57].
- Blokowanie napływu antygenowo swoistych limfocytów T do OUN przez podawanie zwierzętom mAb anty-VLA-4 lub syntetycznego antagonisty VLA-4. Uzyskano znaczne złagodzenie objawów chorobowych u myszy [13]. Badania kliniczne skuteczności działania terapeutycznego przeciwciał anty-VLA-4 wykazały redukcję ognisk zapalnych w mózgu oraz mniejszą liczbę nawrotów choroby [41].
- Zwiększona zapadalność na SM na obszarach o mniejszym nasłonecznieniu, a także w regionach o małym spożyciu witaminy D, pozwoliły na stworzenie hipotezy, że wytwarzany w naszym organizmie hormon – kalcytriol może działać zapobiegawczo w rozwoju SM u genetycznie predysponowanych osobników. Podawanie kalcytriolu zwierzętom znacznie redukuje przebieg kliniczny EAE, co wiązano z syntezą IL-4, TGF- β oraz hamowaniem migracji komórek zapalnych do OUN. W innych badaniach wykazano, że bezpośrednim punktem działania kalcytriolu mogą być limfocyty T CD4 [26,39].
- Obecnie bada się możliwość wykorzystania populacji komórek dendrytycznych zdolnych do indukowania stanu tolerancji w leczeniu schorzeń o podłożu autoimmunizacyjnym. Wykazano, że podskórne podanie zwierzętom DC traktowanych uprzednio *in vitro* IFN- γ lub TGF- β prowadziło do znacznego złagodzenia przebiegu klinicznego EAE. Przypuszcza się, że u podłoża tolerancji indukowanej przez DC leży m.in. zjawisko apoptozy komórek T. Obserwacje poczynione w badaniach *in vitro* ludzkich DC są bardzo obiecujące [36].
- W ciągu ostatnich lat wiele nadziei wiązano z terapią polegającą na wywołaniu tolerancji przez podanie Ag na śluzówki. W warunkach doświadczalnych zjawisko protekcji obserwowano po tolerancji zwierząt pasadowym białkiem mieliny (MBP) wprowadzonym *per os* lub na błonę śluzową nosa. Wykazano, że za obserwowany stan tolerancji były odpowiedzialne limfocyty Ts wytwarzające cytokiny przeciwzapalne, takie jak: IL-4, IL-10 oraz TGF- β . Korzystne wyniki badań uzyskane na zwierzętach laboratoryjnych niestety nie znalazły potwierdzenia w próbach klinicznych podczas leczenia pacjentów z SM [18,76].

MECHANIZMY ZAANGAŻOWANE W UTRZYMANIU TOLERANCJI OBWODOWEJ

W klasycznym ujęciu stan tolerancji był rozumiany, jako brak odpowiedzi immunologicznej na własne Ag organi-

zmu, będący wynikiem eliminacji w okresie noworodkowym „zakazanych” klonów komórek B i T. Obecnie wiadomo, że za stan tolerancji odpowiadają złożone mechanizmy regulacyjne związane z delecją, anergią klonalną oraz z aktywną supresją mediowaną przez komórki regulacyjne. Autoreaktywne limfocyty zdolne do rozpoznania własnych Ag, np.: mózgu, tyreoglobuliny czy kolagenu, występują u zdrowych osobników i pozostają nieszkodliwe w prawidłowych warunkach, a co więcej, mogą pełnić ważną funkcję w utrzymaniu tkankowej homeostazy [72].

W związku z tym, że proces selekcji negatywnej nie prowadzi do eliminacji wszystkich potencjalnie groźnych limfocytów, muszą istnieć mechanizmy niedopuszczające do ich aktywacji na obwodzie. Przypuszcza się, że już na poziomie selekcji w grasicy powstają tzw. naturalne limfocyty T regulacyjne (Treg), określane w literaturze także jako supresyjne (Ts). Do takich komórek zalicza się limfocyty T o fenotypie $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{CD4}^+ \text{CD25}^+$, które hamują odpowiedź immunologiczną *in vivo* i *in vitro* antygenowo nieswoiście. Komórki regulacyjne stanowią populację względnie krótko żyjące, dlatego stale poszukuje się metod pozwalających na ewentualną ich aktywację, co mogłoby w pewnych przypadkach znaleźć zastosowanie w terapii pozwalając na manipulowanie odpowiedzią immunologiczną.

Odpowiedź immunologiczna poza regulacją przez naturalne, antygenowo nieswoiste komórki Ts ($\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$) znajduje się również pod negatywną kontrolą antygenowo swoistych limfocytów Ts. Mechanizmy negatywnej regulacji mediowanej przez antygenowo swoiste komórki Ts najlepiej poznano w badaniach nadwrażliwości kontaktowej (CS). W układzie tym wykazano, że odpowiedź Th1-zależna znajduje się pod negatywną kontrolą dwóch różnych populacji komórek Ts o fenotypie $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{CD8}^+$, a także antygenowo swoistych limfocytów $\text{TCR}\gamma\delta^+$ [60,62].

Warto również zaznaczyć, że w trakcie nabytej odpowiedzi immunologicznej powstają populacje komórek regulacyjnych, które przypuszczalnie mogą się różnicować z $\text{CD4}^+ \text{CD25}^-$, a także z $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$ [8]. Opisano kilka subpopulacji limfocytów CD4^+ o aktywności supresyjnej, mediowanej głównie przez uwalniane cytokiny. Należą do nich komórki: Tr1 wytwarzające głównie IL-10, Th3 uwalniające TGF- β , oraz klasyczne Th2 wydzielające IL-4, IL-10 oraz IL-13. Uważa się że, główną rolą komórek Ts jest prawdopodobnie utrzymanie obwodowej tolerancji i homeostazy.

Powyższe doniesienia wskazują na istnienie wielu mechanizmów kontrolujących równowagę reakcji immunologicznej, wielu zależności i sprzężeń zwrotnych, które wciąż pozostają niewyjaśnione.

TOLERANCJA POKARMOWA

Podawanie antygenów drogą pokarmową jest klasyczną metodą indukowania swoistej immunosupresji stosowaną już przez starożytnych władców, którzy przyjmowali niewielkie dawki trucizn w obawie przed otruciem. Bliższe poznanie mechanizmu tolerancji pokarmowej zawdzięcza się badaniom laboratoryjnym na zwierzętach, opisanych po raz pierwszy przez Wellsa w 1911 r. [74]. Jednak dopiero w 1946 r. natura tolerancji pokarmowej została wyjaśniona przez Chasea i Sulzbergera [16, 58].

Naukowcy od lat badają mechanizmy regulacyjne związane z fenomenem tolerancji pokarmowej. W wielu modelach zwierzęcych, stanowiących odpowiedniki ludzkich chorób autoimmunizacyjnych, bada się wpływ podawania autoantygenów drogą pokarmową na rozwój choroby. Podanie odpowiednich antygenów *per os* prowadzi do złagodzenia przebiegu klinicznego eksperymentalnego autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia, eksperymentalnego zapalenia stawów, zespołu antyfosfolipidowego, insulinozależnej cukrzycy, zapalenia nerwów obwodowych [34]. Określenie jednolitego mechanizmu tolerancji pokarmowej jest jednak utrudnione przez różnice związane z podłożem genetycznym, wiekiem zwierząt, funkcjonowaniem mikroflory bakteryjnej, integralnością bariery nabłonkowej, profilem lokalnie wydzielanych cytokin, odmienną ekspresją molekuł adhezyjnych, czy też dawką i strukturą Ag.

Komórki regulacyjne generowane w trakcie karmienia szczurów Lewis małymi dawkami MBP, które hamują funkcje komórek efektorowych Th1, należą do populacji limfocytów T CD8^+ . W podobnym schemacie badań prowadzonych na myszach transgenicznym za aktywną supresję są odpowiedzialne oprócz limfocytów T CD8^+ również limfocyty T CD4^+ . Opisane klony komórek Ts są identyczne pod względem budowy TCR oraz restrykcji MHC do komórek efektorowych Th1, jednak po stymulacji Ag wydzielają supresyjne cytokiny (TGF- β , IL-4, IL-10), które hamują proliferację i uwalnianie cytokin przez komórki Th1, natomiast supresja zostaje zniesiona po wstrzyknięciu mAb anti-TGF- β [32,73].

Inne badania wykazały, że małe dawki Ag podawane drogą pokarmową zwierzętom bez adiuwantu, prowadzą do generowania populacji limfocytów T $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$ w tkankach obwodowych, przypuszczalnie alternatywnie do grasiczej drogi ich powstawania. Obwodowe komórki T $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$ po stymulacji są zdolne wytwarzać TGF- β oraz IL-10, wykazują dużą ekspresję CTLA-4 i fenotyp komórek pamięci [66]. Obserwowano również, że po zastosowaniu małych dawek Ag dochodzi do różnicowania naiwnych komórek T CD4^+ w limfocyty Th3, które nie wykazują ekspresji CD25 , są odporne na delecję i wydzielają duże ilości TGF- β . W przypadku supresji mediowanej przez limfocyty Th3 może być ona zniesiona *in vitro* przez podanie mAb anti-TGF- β , natomiast supresja indukowana przez $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$ jest nieodwracalna. Przypuszcza się, że komórki $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$ mają zdolność wiązania TGF- β na swojej powierzchni i wykorzystywania go w bezpośrednim kontakcie z komórkami efektorowymi, co wskazuje na odmienny mechanizm działania opisanych populacji komórek supresyjnych [77].

Z kolei duże dawki Ag podane drogą pokarmową w odróżnieniu od małych dawek przenikają do krążenia w postaci natywnej, bądź jedynie częściowo zmienionej. Tolerancja obserwowana u myszy traktowanych dużymi dawkami OVA jest wynikiem głównie delecji klonalnej antygenowo swoistych limfocytów T. Istnieje również doniesienia na temat generowania pod wpływem dużych dawek Ag komórek Ts CD4^+ nieswoistych względem Ag i cechujących się wysoką ekspresją FasL oraz sekrecją IL-4, IL-10, TGF- β . Przypuszcza się, że komórki te powstają w wątrobie lub układzie GALT [71,73].

Wątroba przyczynia się do utrzymania stanu tolerancji, a co więcej jest bezpośrednio zaangażowana w indukowanie tolerancji pokarmowej. Podanie Ag do żyły wrotnej wątroby zwierząt prowadzi do stanu uogólnionej tolerancji analogicznej do tej indukowanej drogą pokarmową [43]. Badania śródbłonna zatok wątrobowych (LSEC) wskazują na zdolność tych komórek do wychwytywania Ag z krwi oraz stymulowania naiwnych limfocytów T CD4⁺ do pełnienia funkcji komórek Ts. LSEC mogą również uczestniczyć w krzyżowej prezentacji egzogennych Ag limfocytom T CD8⁺ i indukowania tolerancji na te Ag [33]. Wątroba jako organ narażony na ciągłą ekspozycję na egzogenne Ag dostarczane z pokarmem jest bogato wyposażona w komórki układu immunologicznego. Prócz konwencjonalnych populacji komórek obejmujących: limfocyty B, limfocyty T (CD4⁺, CD8⁺), komórki NK wykazano obecność znacznego odsetka populacji komórek nietypowych: CD3⁺CD56⁺ (31,5%), CD8αα (15,4%), CD3⁺CD4⁺CD8⁻ (14,5%), CD3⁺CD4⁺CD8⁺ (5,5%), TCRγδ (2,7%) oraz limfocyty NKT (około 30%).

Obecność różnych populacji komórek układu limfatycznego sugeruje udział wątroby w pozagracicznym dojrzewaniu i różnicowaniu limfocytów oprócz jelita cienkiego. Możliwość lokalnego generowania subpopulacji limfocytów T może się wiązać z mechanizmami regulacji odpowiedzi immunologicznej zmierzającej do eliminacji patogenów, inicjowaniu stanu tolerancji na czynniki nieszkodliwe, oraz utrzymaniu autotolerancji [44].

Należy zaznaczyć, że istnieje wiele sprzecznych doniesień dotyczących powstania komórek regulacyjnych w układzie immunologicznym błon śluzowych. Poza istnieniem klasycznych komórek T regulacyjnych (CD4⁺ CD25⁺) oraz limfocytów regulacyjnych Tr1 i Th3, funkcję komórek supresyjnych mogą również pełnić limfocyty niekonwencjonalne: CD8αα, podwójnie negatywne CD4⁻ CD8⁻, podwójnie pozytywne CD4⁺ CD8⁺, pochodzenia pozagracicznego z receptorami TCRαβ, a także limfocyty TCRγδ. Aktywność supresyjna tych komórek jest wynikiem bezpośredniego kontaktu z komórkami efektorowymi oraz uwalniania cytokin, głównie: IL-4, IL-10, TGF-β [10]. Z przytoczonych informacji na temat mechanizmów tolerancji pokarmowej wynika, że jest to proces bardzo złożony, w którym jest zaangażowane wiele populacji komórek regulacyjnych i których powstawanie uwarunkowane jest różnymi czynnikami.

SKÓRA JAKO MIEJSCE INDUKCJI TOLERANCJI IMMUNOLOGICZNEJ

Skóra, podobnie jak błony śluzowe, jest stale eksponowana na liczne antygeny znajdujące się w otoczeniu. Układ odpornościowy skóry narażony na szkodliwe działanie mikroorganizmów, alergenów, alloantygenów czy też antygenów nowotworowych, aktywuje mechanizmy zmierzające do eliminacji zagrożenia.

Najbardziej efektywnymi APC ustroju są znajdujące się w naskórku komórki Langerhansa (LC), które mają konstytutywnie Ag MHC klasy II na swej powierzchni i słabe właściwości fagocytarne. Funkcja LC polega na wychwytywaniu i przetwarzaniu Ag w obrębie skóry, aktywacji limfocytów T pamięci oraz migracji do lokalnych węzłów chłonnych, gdzie prezentują Ag naiwnym limfocytom T. Zaburzenie prawidłowej funkcji LC (np. poprzez promie-

niowanie UV) może prowadzić do rozwoju alergii lub tolerancji na dany Ag.

Istotną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej pełnią keratynocyty znajdujące się w naskórku. Keratynocyty po odpowiedniej stymulacji są zdolne do fagocytozy i ekspresji Ag MHC klasy II (podobnie jak komórki śródbłonna naczyń), a także do wydzielania wielu cytokin o działaniu immunostymulującym i immunosupresyjnym. Niedostateczna stymulacja limfocytów T pochodząca od nieprofesjonalnych APC, takich jak keratynocyty czy fibroblasty, może wpływać hamująco nie tylko na dojrzewanie naiwnych komórek T, ale również aktywację dojrzałych limfocytów. W przeciwieństwie do profesjonalnych APC keratynocyty nie mają na swej powierzchni molekuł kostymulacyjnych, co nie pozwala na pełną aktywację limfocytów T natomiast mogą prowadzić do anergii lub delekcji klonalnej limfocytów.

Limfocyty T występujące w naskórku stanowią prawie wyłącznie populację komórek pamięci, a większość wykazuje ekspresję koreceptora CD8. W odróżnieniu od myszy, u których wykryto obecność dendrytycznych komórek naskórkowych (DETC) będących populacją limfocytów TCRγδ, w ludzkiej skórze dominuje populacja limfocytów TCRαβ (w stosunku 10:1) [52].

W skórze właściwej limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ występują w podobnych proporcjach. Makrofagi koncentrują się głównie w pobliżu błony podstawnej, natomiast komórki tuczne i populacja komórek dendrytycznych (różniąc się od LC ekspresją molekuł powierzchniowych) skupiają się wokół naczyń krwionośnych. Dodatkowo komórki śródbłonna, fibroblasty oraz zakończenia nerwowe współpracują z komórkami układu odpornościowego w procesie amplifikacji sygnału zagrożenia i rekrutacji komórek z krążenia do miejsca toczącego się procesu zapalnego.

Nadwrażliwość kontaktowa (CS), która jest nadwrażliwością typu późnego (DTH) stanowi model doświadczalny, który pozwala badać odpowiedź immunologiczną w skórze. CS rozwija się po aplikacji na skórę lub błony śluzowe substancji niskocząsteczkowych (haptenu), które wiążą się trwale z białkami ustroju tworząc neoantygeny. W przebiegu CS i DTH wyróżnia się fazę indukcyjną i efektorową. W trakcie pierwszej fazy, wskutek immunizacji Ag, dochodzi do aktywacji i klonalnej ekspansji limfocytów T antygenowo swoistych, oraz stymulacji limfocytów B1 do wytwarzania swoistych przeciwciał IgM. Po ponownym kontakcie z Ag powstają kompleksy Ag-IgM, które wyzwalają kaskadę reakcji związanych z odpowiedzią wrodzoną: aktywację dopełniacza na drodze klasycznej, stymulację komórek tucznych i płytek krwi do wydzielania serotoniny i TNF-α. W wyniku działania tych czynników na śródbłonek naczyń dochodzi do rekrutacji limfocytów T efektorowych późnej fazy DTH i CS, należących do populacji komórek Th1 [4].

Z przytoczonych faktów wynika, że w skórze można stosunkowo łatwo wywołać silną odpowiedź immunologiczną, podczas gdy niewiele wiadomo na temat tego narządu jako miejsca indukcji tolerancji. Z końcem lat 90 ub.w. Wang i wsp. [69] wykazali, że podanie na skórę Ag białkowego prowadzi do wytwarzania przeciwciał IgE oraz

IgG1. Syntezie wspomnianych izotypów przeciwciał towarzyszyło wytwarzanie cytokin typowych dla limfocytów Th2. Kilka lat później Herrick i wsp. wykazali, że aplikacja Ag białkowego na skórę pozwala na indukcję Th2-zależnego modelu astmy u myszy [28,69]. Przytoczone wyniki badań pozwoliły na stworzenie hipotezy, iż podobnie jak to się dzieje w przypadku błon śluzowych, również podanie Ag białkowego na skórę przy spełnieniu odpowiednich warunków może prowadzić do przesunięcia odpowiedzi immunologicznej z Th1 w kierunku Th2, co z kolei mogłoby pozwolić na negatywną regulację odpowiedzi Th1-zależnej.

Badania własne autorów na modelu CS wykazały, że istotnie podanie Ag białkowego na skórę przed wywołaniem reakcji CS prowadzi do znacznego zahamowania odpowiedzi Th1-zależnej [48,59,61]. Ponieważ komórki Th1 odgrywają główną rolę w rozwoju procesu zapalnego leżącego u podstaw wielu schorzeń autoimmunizacyjnych, w tym również SM, na bazie wyników uzyskanych na modelu CS powstał projekt mający na celu zbadanie czy naskórna immunizacja MBP pozwoli na hamowanie procesu zapalnego powstałego w modelu zwierzęcym SM.

Z badań własnych wynika, że podanie MBP na skórę myszy prowadzi do indukcji stanu tolerancji przejawiającej się zmniejszoną zachorowalnością, łagodniejszym przebiegiem choroby oraz opóźnieniem pojawiania się objawów klinicznych w stosunku do kontroli pozytywnej. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość indukowania tzw. tolerancji zakaźnej, którą można przenieść na naiwnych syngenicznym biorców za pośrednictwem komórek regulacyjnych generowanych przez aplikację białkowego Ag na skórę. Po naskórnej immunizacji MBP obserwowano pojawienie się około 2–3% komórek $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{CD4}^+ \text{CD8}^+$ w obwodowych węzłach chłonnych oraz śledzionie. Podwyższoną liczbę komórek $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{CD4}^+ \text{CD8}^+$ obserwowano w dniu „+7” od naskórnej immunizacji i stan ten utrzymywał się przez tydzień. Następnie odsetek komórek $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{CD4}^+ \text{CD8}^+$ powracał do wartości obserwowanej u myszy naiwnych [9].

Dalsze badania wykazały, że podwójnie pozytywne limfocyty $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{CD4}^+ \text{CD8}^+$ powstające po naskórnej immunizacji MBP są odpowiedzialne za hamowanie procesu zapalnego w EAE. Komórki te mają znaczny potencjał supresyjny, gdyż stosunkowo niewielka liczba komórek hamuje rozwój choroby u biorców transferu [63]. Z kolei w badaniach nad tolerancją pokarmową wykazano obecność limfocytów śródnaślonkowych (IEL), należących do populacji komórek $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{CD4}^+ \text{CD8}^+$ i wytwarzających cytokiny przeciwzapalne, takie jak IL-10 oraz TGF- β , co może wskazywać na ich aktywność supresyjną [23,24].

Istnieją doniesienia, że odsetek komórek $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{CD4}^+ \text{CD8}^+$ wzrasta u myszy oraz ludzi na obwodzie w okresie płodowym, a także w określonych typach zakażeń, schorzeń autoimmunizacyjnych i nowotworowych, u biorców przeszczepu oraz w procesie starzenia się organizmu [30,35]. Limfocyty T $\text{CD4}^+ \text{CD8}^+$ u ludzi zdrowych oraz u gryzoni (myszy i szczurów) stanowią tylko nieznaczny procent limfocytów T krwi obwodowej, poniżej 1%, podczas gdy u wielu gatunków zwierząt (małp, świń, kurczaków) mogą stanowić dominującą populację komórek T.

Komórki te wykazują fenotyp komórek pamięci, ekspresję powierzchniową molekuly $\text{CD8}\alpha\alpha$, a ich odsetek wzrasta z wiekiem zwierząt [78].

Już w 1985 r. Blue i wsp. wykryli po raz pierwszy obecność prawie 3% komórek $\text{CD4}^+ \text{CD8}^+$ we krwi obwodowej zdrowych ludzi. Jednoczesna ekspresja T4 i T8 dotyczyła głównie dużych limfocytów, podobnych do blastów i wydawała się korelować ze stanem aktywacji komórek. Natomiast stymulacja *in vitro* limfocytów krwi obwodowej konkaliną A prowadziła do koekspresji T4 i T8 na powierzchni około 60% limfocytów [7]. Warto wspomnieć, że Pette i wsp. w 1990 r. dokonali interesującej obserwacji, że wśród swoistych względem MBP limfocytów T izolowanych z krwi obwodowej chorych na SM, większość komórek miało fenotyp $\text{CD3}^+ \text{CD4}^+ \text{CD8}^+$, podczas gdy autoreaktywne klony pozyskane od zdrowych pacjentów grupy kontrolnej wykazały fenotyp $\text{CD3}^+ \text{CD4}^+ \text{CD8}^+$ w zakresie 22–87% całkowitej puli komórek [46]. Wyniki wspomnianych badań mogą sugerować udział komórek podwójnie pozytywnych w procesach immunoregulacji i utrzymaniu homeostazy immunologicznej, które u chorych na SM zostały zaburzone.

Limfocyty T $\text{CD4}^+ \text{CD8}^+$ mogą stanowić populację limfocytów T, które przedwcześnie opuściły grasicę lub komórki T $\text{CD4}^+ \text{CD8}^-$ na powierzchni których ponownie pojawił się koreceptor CD8 w wyniku aktywacji lub ekspozycji na działanie cytokin np.: IL-4. W opisywanym przypadku tolerancji indukowanej przez skórę pojawienie się w obwodowych narządach chłonnych komórek T $\text{CD4}^+ \text{CD8}^+$ może być wynikiem przedwczesnej ucieczki nie w pełni dojrzałych limfocytów T z grasicy. Z kolei powrót liczby komórek T $\text{CD4}^+ \text{CD8}^+$ w ciągu jednego tygodnia do wartości obserwowanej u naiwnych myszy może sugerować, iż komórki te przekształcają się na obwodzie w komórki T CD4^+ [63].

W klasycznej supresji mediowanej przez limfocyty T regulatorowe zarówno komórka supresyjna, jak również komórka efektorowa zazwyczaj są swoiste dla tego samego Ag. W opisywanym modelu tolerancji wywołanej przez podanie Ag na skórę obserwowano brak swoistości antygenowej, który przypomina zjawisko określane jako efekt „przygodnego widza” (bystander suppression). Komórka supresyjna aktywowana przez określony Ag wydzielala antygenowo nieswoiste cytokiny, które hamują odpowiedź immunologiczną mediowaną przez komórki T efektorowe o innej swoistości aniżeli limfocyt T supresyjny. W modelu tolerancji pokarmowej wykazano jednak, że tolerancja pokarmowa jest wynikiem antygenowo swoistej aktywacji komórek T supresyjnych, które wywierają swoje działanie w fazie efektorowej za pośrednictwem uwalnianych antygenowo nieswoistych cytokin [17,29].

W badaniach nad tolerancją indukowaną przez skórę aplikacja antygenów białkowych nie reagujących krzyżowo z MBP prowadzi do znacznego złagodzenia przebiegu EAE co jest wynikiem działania TGF- β uwalnianego przez limfocyty supresyjne T $\text{CD4}^+ \text{CD8}^+$. Podobne obserwacje poczyniono na modelu reakcji CS oraz DTH, gdzie komórki T supresyjne indukowane drogą naskórnej immunizacji hamowały odpowiedź Th1-zależną, w sposób antygenowo nieswoisty [9,61]. Z przytoczonych wyników badań wynika, że obecność antygenów odpowiedzialnego za powstanie komórek T supresyjnych nie jest konieczna w fazie efektorowej supresji. To z kolei może wska-

zywać na to, że supresja indukowana przez skórę działa za pośrednictwem innych mechanizmów aniżeli tych, które występują w tolerancji pokarmowej. Antygen użyty do indukcji tolerancji przez skórę może pozostawać na długo w obwodowych narządach chłonnych, albo też uwalnianie przez komórki T supresyjne cytokiny przeciwpapalne interferują z indukcją i/lub funkcją efektorową limfocytów Th1.

Podsumowując wyniki badań możliwości przywrócenia tolerancji na autoantygeny mieliny można stwierdzić znaczne podobieństwo opisywanego fenomenu supresji wywołanej przez skórę do mechanizmów tolerancji śluzówkowej, co tym samym sugeruje podobieństwo mechanizmów supresji działających na dwóch powierzchniach organizmu. Jednak z klinicznego punktu widzenia istotne jest to, czy możliwe będzie manipulowanie niepożądaną odpowiedzią immunologiczną w chwili wystąpienia choroby. Wyniki

wstępnych doświadczeń w sposób jednoznaczny wykazują, że podanie MBP na skórę zwierząt w chwili pojawiania się choroby prowadzi do znacznego złagodzenia jej przebiegu klinicznego, a tym samym stanowi wyzwanie do dalszych poszukiwań możliwości kontroli reakcji immunologicznych w EAE, a następnie w stwardnieniu rozsianym. W supresji indukowanej przez skórę jest zaangażowana nietypowa populacja komórek podwójnie pozytywnych, jednak nie wiadomo czy komórki regulatorowe CD4⁺ CD8⁺ powodowałyby tolerancję innych niż EAE doświadczalnych chorób z autoagresji.

Opisana metoda wywołania tolerancji przez podanie białkowego antygeny na skórę dzięki skuteczności i prostocie użycia oraz braku inwazyjności stwarza nowe szanse opracowania skutecznej terapii schorzeń autoimmunizacyjnych, u podstaw których leży przewlekły proces zapalny.

PIŚMIENICTWO

- [1] Aharoni R., Teitelbaum D., Sela M., Arnon R.: Copolymer 1 induces T cells of the T helper type 2 that crossreact with myelin basic protein and suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; 94: 10821–10826
- [2] Aloisi F., Ria F., Adorini L.: Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol. Today*, 2000; 21: 141–147
- [3] Alperovitch A., Berr C., Cambon-Thomsen A., Puel J., Dugoujon J.M., Ruidavets J.B., Clanet M.: Viral antibody titers, immunogenetic markers, and their interrelations in multiple sclerosis patients and controls. *Hum. Immunol.*, 1991; 31: 94–99
- [4] Askenase P.W., Szczepanik M., Itakura A., Kiener C., Campos R.A.: Extravascular T-cell recruitment requires initiation begun by Valpha14+ NKT cells and B-1 B cells. *Trends Immunol.*, 2004; 25: 441–449
- [5] Bartholome E.J., Willems F., Crusiaux A., Thielemans K., Schandene L., Goldman M.: Interferon-beta inhibits Th1 responses at the dendritic cell level. Relevance to multiple sclerosis. *Acta Neurol. Belg.*, 1999; 99: 44–52
- [6] Bettelli E., Das M.P., Howard E.D., Weiner H.L., Sobel R.A., Kuchroo V.K.: IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. *J. Immunol.*, 1998; 161: 3299–3306
- [7] Blue M.L., Daley J.F., Levine H., Schlossman S.F.: Coexpression of T4 and T8 on peripheral blood T cells demonstrated by two-color fluorescence flow cytometry. *J. Immunol.*, 1985; 134: 2281–2286
- [8] Bluestone J.A., Abbas A.K.: Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 2003; 3: 253–257
- [9] Bonomo A., Kehn P.J., Shevach E.M.: Premature escape of double-positive thymocytes to the periphery of young mice. Possible role in autoimmunity. *J. Immunol.*, 1994; 152: 1509–1514
- [10] Brandtzaeg P.: History of oral tolerance and mucosal immunity. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 1996; 778: 1–27
- [11] Bright J.J., Topham D.J., Nag B., Lodge P.A., Sriram S.: Vaccination with peptides from MHC class II beta chain hypervariable region caused allele-specific suppression of EAE. *J. Neuroimmunol.*, 1996; 67: 119–124
- [12] Brocke S., Gijbels K., Allegretta M., Ferber I., Piercy C., Blankenstein T., Martin R., Utz U., Karin N., Mitchell D., Veromaa T., Waisman A., Gaur A., Conlon P., Ling N., Fairchild P.J., Wraith D.C., O'Garra A., Fathman C.G., Steinman L.: Treatment of experimental encephalomyelitis with a peptide analogue of myelin basic protein. *Nature*, 1996; 379: 343–346
- [13] Canella B., Gaupp S., Tilton R.G., Raine C.S.: Differential efficacy of synthetic antagonist VLA-4 during the course of chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurosci. Res.*, 2003; 71: 407–416
- [14] Cannella B., Hoban C.J., Gao Y.L., Garcia-Arenas R., Lawson D., Marchionni M., Gwynne D., Raine C.S.: The neuregulin, glial growth factor 2, diminishes autoimmune demyelination and enhances remyelination in a chronic relapsing model for multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 10100–10105
- [15] Challoner P.B., Smith K.T., Parker J.D., MacLeod D.L., Coulter S.N., Rose T.M., Schultz E.R., Bennett J.L., Garber R.L., Chang M., Schad P.A., Stewart P.A., Nowinski R.C., Brown J.P., Burmer G.C.: Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; 92: 7440–7444
- [16] Chase M.W.: Inhibition of experimental drug allergy by prior feeding of the sensitivity agent. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1946; 61: 257–259
- [17] Chen W., Jin W., Wahl S.M.: Engagement of cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4 (CTLA 4) induces transforming growth factor β (TGF- β) production by murine CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.*, 1998; 188: 1849–1857
- [18] Chen Y., Inobe J., Kuchroo V.K., Baron J.L., Janeway C.A. Jr, Weiner H.L.: Oral tolerance in myelin basic protein T-cell receptor transgenic mice: suppression of autoimmune encephalomyelitis and dose-dependent induction of regulatory cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 388–391
- [19] Compston A., Ebers G., Lassmann H., McDonald I., Matthews B., Wekerle H.: The story of multiple sclerosis. In *McAlpine's Multiple Sclerosis*, New York: Churchill Livingstone. 1998; 3–40
- [20] Correale J., Gilmore W., McMillan M., Li S., McCarthy K., Le T., Weiner L.P.: Patterns of cytokine secretion by autoreactive proteolipid protein-specific T cell clones during the course of multiple sclerosis. *J. Immunol.*, 1995; 154: 2959–2968
- [21] Critchfield J.M., Racke M.K., Zuniga-Pflucker J.C., Cannella B., Raine C.S., Goverman J., Lenardo M.J.: T cell deletion in high antigen dose therapy of autoimmune encephalomyelitis. *Science*, 1994; 263: 1139–1143
- [22] Cua D.J., Groux H., Hinton D.R., Stohlman S.A., Coffman R.L.: Transgenic interleukin 10 prevents induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.*, 1999; 189: 1005–1010
- [23] Das G., Janeway C.A. Jr.: MHC specificity of iIELs. *Trends Immunol.*, 2003; 24: 88–93
- [24] Fujihashi K., Yamamoto M., McGhee J.R., Kiyono H.: $\alpha\beta$ T cell receptor positive intraepithelial lymphocytes with CD4⁺, CD8⁺ phenotypes from orally immunized mice provide Th2-like function for B cell responses. *J. Immunol.*, 1993; 151: 6681–6691
- [25] Hafler D.A., Weiner H.L.: Antigen-specific immunosuppression: oral tolerance for the treatment of autoimmune disease. *Chem. Immunol.*, 1995; 60: 126–149
- [26] Hayes C.E.: Vitamin D: a natural inhibitor of multiple sclerosis. *Proc. Nutr. Soc.*, 2000; 59: 531–535
- [27] Herndon R.M.: *Multiple Sclerosis: Immunology, Pathology and Pathophysiology*. New York: Demos Medical Publishing, 2003
- [28] Herrick C.A., MacLeod H., Glusac E., Tigelaar R.E., Bottomly K.: Th2 responses induced by epicutaneous or inhalational protein exposure are differentially dependent on IL-4. *J. Clin. Invest.*, 2000; 105: 765–775
- [29] Hoynes G.F., Lamb J.R.: Regulation of T cell function in mucosal tolerance. *Immunol. Cell Biol.*, 1997; 75: 197–201

- [30] Jimenez E., Sacedon R., Vicente A., Hernandez-Lopez C., Zapata A.G., Varas A.: Rat peripheral CD4⁺ CD8⁺ T lymphocytes are partially immunocompetent thymus-derived cells that undergo post-thymic maturation to become functionally mature CD4⁺ T lymphocytes. *J. Immunol.*, 2002; 168: 5005–5013
- [31] Kennedy K.J., Strieter R.M., Kunkel S.L., Lukacs N.W., Karpus W.J.: Acute and relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis are regulated by differential expression of the CC chemokines macrophage inflammatory protein-1 α and monocyte chemoattractant protein-1. *J. Neuroimmunol.*, 1998; 92: 98–108
- [32] Khouury S.J., Hancock W.W., Weiner H.L.: Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. *J. Exp. Med.*, 1992; 176: 1355–1364
- [33] Knolle P.A., Limmer A.: Control of immune responses by scavenger liver endothelial cells. *Swiss. Med. Wkly.*, 2003; 133: 501–506
- [34] Krause I., Blank M., Shoenfeld Y.: Immunomodulation of experimental autoimmune diseases via oral tolerance. *Crit. Rev. Immunol.*, 2000; 20: 1–16
- [35] Lee W.W., Nam K.H., Terao K., Akari H., Yoshikawa Y.: Age-related increase of peripheral CD4⁺ CD8⁺ double-positive T lymphocytes in cynomolgus monkeys: longitudinal study in relation to thymic involution. *Immunology*, 2003; 109: 217–225
- [36] Link H., Huang Y.M., Masterman T., Xiao B.G.: Vaccination with autologous dendritic cells: from experimental autoimmune encephalomyelitis to multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.*, 2001; 114: 1–7
- [37] Lovett-Racke A.E., Bittner P., Cross A.H., Carlino J.A., Racke M.K.: Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis with insulin-like growth factor (IGF-1) and IGF-1/IGF-binding protein-3 complex (IGF-1/IGFBP3). *J. Clin. Invest.*, 1998; 101: 1797–1804
- [38] Lucchinetti C., Bruck W., Parisi J., Scheithauer B., Rodriguez M., Lassmann H.: Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol.*, 2000; 47: 707–717
- [39] Meehan T.F., Deluca H.F.: CD8⁺ T cells are not necessary for 1 α , 25-dihydroxy-vitamin D3 to suppress experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 5557–5560
- [40] Mendel I., Katz A., Kozak N., Ben-Nun A., Revel M.: Interleukin-6 functions in autoimmune encephalomyelitis: a study in gene-targeted mice. *Eur. J. Immunol.*, 1998; 28: 1727–1737
- [41] Miller D.H., Khan O.A., Sheremata W.A., Blumhardt L.D., Rice G.P., Libonati M.A., Willmer-Hulme A.J., Dalton C.M., Miszkil K.A., O'Connor P.W.; International Natalizumab Multiple Sclerosis Trial Group: A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.*, 2003; 348: 15–23
- [42] Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M. W., Giedlin M.A., Coffman R.L.: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.*, 1986; 136: 2348–2357
- [43] Mowat A.M., Donachie A.M., Parker L.A., Robson N.C., Beacock-Sharp H., McIntyre L.J., Millington O., Chirdo F.: The role of dendritic cells in regulating mucosal immunity and tolerance. *Novartis Found Symp.*, 2003; 252: 291–305
- [44] Norris S., Collins C., Doherty D.G., Smith F., McEntee G., Traynor O., Nolan N., Hegarty J., O'Farrelly C.: Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes. *J. Hepatol.*, 1998; 28: 84–90
- [45] Panitch H.S., Bever C.T. Jr: Clinical trials of interferons in multiple sclerosis. What have we learned? *J. Neuroimmunol.*, 1993; 46: 155–164
- [46] Pette M., Fujita K., Kitz B., Whitaker J.N., Albert E., Kappos L., Wekerle H.: Myelin basic protein-specific T lymphocyte lines from MS patients and healthy individuals. *Neurology*, 1990; 40: 1770–1776
- [47] Pettinelli C.B., McFarlin D.E.: Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after *in vitro* activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes. *J. Immunol.*, 1981; 127: 1420–1423
- [48] Ptak W., Szczepanik M., Bryniarski K., Tutaj M., Ptak M.: Epicutaneous application of protein antigens incorporated into cosmetic cream induces antigen nonspecific unresponsiveness in mice and affects the cell-mediated immune response. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2002; 128: 8–14
- [49] Selmaj K.: Postępowanie w stwardnieniu rozsianym. *Nowa Klinika*, 1999; 6: 222–227
- [50] Selmaj K., Brosnan C.F., Raine C.S.: Colocalization of lymphocytes bearing gamma delta T-cell receptor and heat shock protein hsp65+ oligodendrocytes in multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; 88: 6452–6456
- [51] Selmaj K., Raine C.S.: Experimental autoimmune encephalomyelitis: immunotherapy with anti-tumor necrosis factor antibodies and soluble tumor necrosis factor receptors. *Neurology*, 1995; 45: S44–S49
- [52] Spellberg B.: The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. *Life Sci.*, 2000; 67: 477–502
- [53] Stelmasiak Z.: Praktyczne aspekty stwardnienia rozsianego. *Medycyna Rodzinna*, 2001; 12: 5–9
- [54] Stinissen P., Raus J., Zhang J.: Autoimmune pathogenesis of multiple sclerosis: role of autoreactive T lymphocytes and new immunotherapeutic strategies. *Crit. Rev. Immunol.*, 1997; 17: 33–75
- [55] Stinissen P., Zhang J., Medaer R., Vandevyver C., Raus J.: Vaccination with autoreactive T cell clones in multiple sclerosis: overview of immunological and clinical data. *J. Neurosci. Res.*, 1996; 45: 500–511
- [56] Stuerzebecher S., Martin R.: Neuroimmunology of multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *Neuroimaging Clin. N. Am.*, 2000; 10: 649–668
- [57] Subramanian S., Matejuk A., Zamora A., VandenBark A.A., Offner H.: Oral feeding with ethinyl estradiol suppresses and treats experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice and inhibits the recruitment of inflammatory cells into the central nervous system. *J. Immunol.*, 2003; 170: 1548–1555
- [58] Sulzberger MB: Arspenname hypersensitivity in guinea-pigs. Experiments demonstrating the role of skin, both as originator and as site of hypersensitivity. *Arch. Dermatol. Syphilol.*, 1930; 22: 839
- [59] Szczepanik M.: Regulation of contact hypersensitivity responses by different populations of T suppressor cells. Skin induced tolerance and its clinical implication. *Recent. Res. Devel. Immunol.*, 2002; 4: 641–668
- [60] Szczepanik M.: Regulation of the contact sensitivity reaction by suppression of T gamma delta lymphocytes. *Folia Med. Cracov.*, 1998; 39: 5–33
- [61] Szczepanik M.: Skin induced tolerance and its clinical implications. *Modern Asp. Immunobiol.*, 2002; 2: 265–268
- [62] Szczepanik M., Anderson L.R., Ushio H., Ptak W., Owen M.J., Hayday A.C., Askenase P.W.: Gamma delta T cells from tolerized alpha beta T cell receptor (TCR)-deficient mice inhibit contact sensitivity-effector T cells *in vivo*, and their interferon-gamma production *in vitro*. *J. Exp. Med.*, 1996; 184: 2129–2139
- [63] Szczepanik M., Bryniarski K., Tutaj M., Ptak M., Skrzeczynska J., Askenase P.W., Ptak W.: Epicutaneous immunization induces alpha beta T-cell receptor CD4 CD8 double-positive non-specific suppressor T cells that inhibit contact sensitivity via transforming growth factor-beta. *Immunology*, 2005; 115: 42–54
- [64] Tanuma N., Abe S., Shin T., Kojima T., Ishihara Y., Arai Y., Toyoshima S., Matsumoto Y.: Pretreatment with T cell receptor peptides using a conventional immunization protocol does not induce effective protection against autoimmune encephalomyelitis. *Cell. Immunol.*, 1996; 168: 85–90
- [65] Teitelbaum D., Arnon R., Sela M.: Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of copolymer I. *Immunology*, 1999; 96: 3842–3847
- [66] Thorstenson K.M., Khoruts A.: Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25⁺CD4⁺ T cells *in vivo* after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen. *J. Immunol.*, 2001; 167: 188–195
- [67] Tuohy V.K., Mathisen P.M.: T cell design for therapy in autoimmune demyelinating disease. *J. Neuroimmunol.*, 2000; 107: 226–232
- [68] Twycross R.: Symptom management in advanced cancer. 2nd edition, Oxford: Radcliffe Medical Press., 1997: 222–231
- [69] Wang L.F., Lin J.Y., Hsieh K.L., Lin R.H.: Epicutaneous exposure of protein antigen induces a predominant Th2-like responses with high IgE production in mice. *J. Immunol.*, 1996; 156: 4079–4082
- [70] Washington R., Burton J., Todd R., Newman W., Dragovic L., Dore-Duffy P.: Expression of immunologically relevant endothelial cell activation antigens on isolated central nervous system microvessels from patients with multiple sclerosis. *Ann. Neurol.*, 1994; 35: 89–97
- [71] Watanabe T., Yoshida M., Shirai Y., Yamori M., Yagita H., Itoh T., Chiba T., Kita T., Wakatsuki Y.: Administration of an antigen at a high dose generates regulatory CD4⁺ T cells expressing CD95 ligand and secreting IL-4 in the liver. *J. Immunol.*, 2002; 168: 2188–2199
- [72] Weiner H.L.: Oral tolerance, an active immunologic process mediated by multiple mechanisms. *J. Clin. Invest.*, 2000; 106: 935–937

- [73] Weiner H.L.: Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect.*, 2001; 3: 947–954
- [74] Wells H.: Studies on the chemistry of anaphylaxis. III. Experiments with isolated proteins, especially those of hen's egg. *J. Infect. Dis.*, 1911; 9: 147–151
- [75] Wyss-Coray T., Lin C., Yan F., Yu G.Q., Rohde M., McConlogue L., Masliah E., Mucke L.: TGF-beta1 promotes microglial amyloid-beta clearance and reduces plaque burden in transgenic mice. *Nat. Med.*, 2001; 7: 612–618
- [76] Xiao B., Link H.: Mucosal tolerance: a two-edged sword to prevent and treat autoimmune diseases. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1997; 85: 119–128
- [77] Zhang X., Izikson L., Liu L., Weiner H.L.: Activation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration. *J. Immunol.*, 2001; 167: 4245–4253
- [78] Zuckermann F.A.: Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1999; 72: 55–66